家蚕细胞周期蛋白基因 *BmCcnl1* 的克隆及表达分析

范兰芬, 钟杨生, 林健荣*

(华南农业大学动物科学学院, 广州 510642)

摘要: 家蚕 *Bombyx mori* 由受精卵到完成胚胎发育孵化的过程中, 细胞进行大量的分裂和分化, 然而滞育性卵的胚胎细胞分化至 G2 期便停滞在此阶段。为了探索这一发育阶段细胞内的分子调控, 本研究以人 *Homo sapiens* 的细胞周期蛋白基因 *cyclin L1* 为模板, 成功克隆了家蚕同源基因 *BmCcnl1*(GenBank 登录号: FJ889988)。*BmCcnl1* 基因开放阅读框(open reading frame, ORF)全长 1 254 bp, 编码 417 个氨基酸。利用 Protean 软件分析得出 BmCcnl1 蛋白预测分子量为 49 kDa, 等电点为 9.84。利用 DNA 重组技术构建了 *BmCcnl1* 基因的重组表达载体 pET-21d-*BmCcnl1*, 对其进行原核表达, 其表达的蛋白以包涵体形式存在。利用 RT-PCR 技术分析了 *BmCcnl1* 基因在胚胎发育过程中的转录水平, *BmCcnl1* 基因在非滞育性卵的胚胎发育阶段基本保持相对稳定的转录表达, 而滞育性卵从蛾体产下经过 72 h 后已经检测不到 *BmCcnl1* 基因的转录。结果提示, *BmCcnl1* 基因与胚胎期滞育及非滞育性卵的发育调控相关。对该基因的克隆和表达分析为今后研究家蚕胚胎发育及细胞周期调控奠定了基础。

关键词: 家蚕; 细胞周期蛋白; 克隆; 表达; 滞育

中图分类号: Q965 **文献标识码**: A **文章编号**: 0454-6296(2010)12-1325-08

Cloning and expression analysis of the cyclin gene *BmCcnl1* in the silkworm, *Bombyx mori*

FAN Lan-Fen, ZHONG Yang-Sheng, LIN Jian-Rong* (Department of Animal Science, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

Abstract: Cell division and differentiation were processing in quantity from the fertilized eggs to larvae of the silkworm, *Bombyx mori*, but in diapause eggs embryonic development arrested in the G2 of cell division. In order to explore the molecular regulation in this developmental stage, the cyclin gene of *B. mori* was cloned according to the *cyclin L1* sequence of *Homo sapiens* and named *BmCcnl1*. The ORF of *BmCcnl1* is 1 254 bp, encoding a 417-amino acid protein and registered with GenBank accession number FJ889988. The predicted molecular weight and isoelectric point of BmCcnl1 protein were 49 kDa and 9.84, respectively analyzed by Protean software. The prokaryotic expression vector pET-21d-*BmCcnl1* was constructed, and the expression product was present in inclusion bodies. The expression of the *BmCcnl1* mRNA was detected using RT-PCR. The relative expression level of *BmCcnl1* mRNA was stable in the embryonic stage of non-diapause eggs, but its expression was not detectable 72 h after oviposition. The results suggest that *BmCcnl1* is related to the development regulation of the diapause and non-diapause eggs. The cloning and expression analysis of *BmCcnl1* provide the basis for the research of the embryonic development and cell cycle regulation.

Key words: *Bombyx mori*; cyclin; clone; expression; diapause

细胞周期(cell cycle)是细胞生命活动的基本过程, 可以分成 G1, S, G2, M 4 个时期。现已发现与细胞周期相关联的调控因子大致分成三大类: 细胞周期蛋白(cyclin)、细胞周期蛋白依赖性激酶(cyclin-dependent kinase, CDK)和细胞周期蛋白依赖性激酶抑制剂(CDK inhibitor, CKI)(邹向阳和李连宏, 2006)。其中细胞周期依赖性蛋白激酶是细胞周期调控的关键因素, 它们各自在特定的细胞周期被激活,其功能实现还依赖于细胞周期蛋白。细胞周期蛋白在不同的细胞周期表达量不同, 但

基金项目: 国家自然科学基金项目(30771634)

作者简介: 范兰芬, 女, 1981 年生, 山东淄博人, 博士, 研究方向为昆虫蛋白质组学及分子生物学, E-mail: lanfenf@yahoo.com.cn

* 通讯作者 Corresponding author, E-mail: jrlin@scau.edu.cn

收稿日期 Received: 2010-05-11; 接受日期 Accepted: 2010-10-10

CDKs 的蛋白总量在整个细胞周期进程中几乎稳定不变(高燕等, 2005)。CDK 的活性除了受细胞周期蛋白的正向调节外, 还受依赖性蛋白激酶抑制剂(CKIs)的负调节(Sherr and Roberts, 1999)。在高等真核生物中, G1 到 S 期的转换是由 G1 细胞周期蛋白(Cyclin D 和 Cyclin E)协同激酶 Cdk2, Cdk4, Cdk6 介导的(Pines and Hunter, 1991; Reed, 1992; Sherr, 1994; Duronio *et al.*, 1995); G2 到 M 期的转换是由有丝分裂细胞周期蛋白(Cyclin A 和 Cyclin B)与激酶 Cdc2 或 Cdk2 共同调控的(Fang and Newport, 1993; Knoblich and Lehner, 1993)。

细胞周期蛋白种类很多, 它们组成了一个蛋白质家族。人类细胞周期蛋白的相对分子量为 30 ~ 45 kDa, 均具有一个细胞周期蛋白盒(杨兆颖和李金梁, 2004), 细胞周期蛋白盒介导 Cyclin 和 Cdk 之间的结合。在细胞周期中, 不同的 Cyclin 与相应的 Cdk 结合后, 形成复合物, 激活 Cdk 的激酶活性, 对细胞内底物进行磷酸化, 随后迅速降解失活(Hunter and Pines, 1994)。

目前对家蚕细胞周期蛋白的研究报道较少。已报道的家蚕细胞周期蛋白仅有 Cyclin A(张春冬等, 2009), Cyclin B(Takahashi *et al.*, 1996)和 Cyclin E(Sudhakar and Gopinathan, 2000)。在家蚕胚胎发育过程中, 受精卵进行大量的细胞分裂与分化。对于滞育性的蚕卵, 在滞育激素的作用下胚胎细胞在产后 3 d(25℃)分裂变慢并停滞于细胞分裂的 G2 期(Nakagaki *et al.*, 1991), 从而进入滞育(徐卫华, 1999)。为此本研究从细胞周期蛋白的角度进行探索, 克隆了家蚕细胞周期蛋白基因, 并对其序列信息进行了分析, 为研究家蚕胚胎发育及细胞周期调控的机制奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料

家蚕 932 品种产卵后 1 - 7 d 的滞育与非滞育性卵, 大肠杆菌 *Escherichia coli* DH5α 和 Rosetta, 表达载体质粒 pET-21d 均由本实验室保存提供。克隆载体 pCR® 2.1, Trizol 购自 Invitrogen 公司; 质粒抽提试剂盒、凝胶回收试剂盒、dNTP、限制性内切酶、Taq DNA 聚合酶、反应缓冲液及其他常规化学试剂均为 TaKaRa 公司产品; cDNA 合成试剂盒, DNA Molecular Weight Marker 购自天根生物有限公司。

1.2 总 RNA 提取

取家蚕 932 品种产卵后 1 - 7 d 的滞育与非滞育性卵各 0.1 g 放入研钵中, 加入液氮充分研磨后按照 Invitrogen 公司的 Trizol 试剂盒的说明提取 RNA, 最后将提取的 RNA 溶于 20 μL DEPC 水中, -70℃保存备用。

1.3 家蚕细胞周期蛋白基因的电子拼接和克隆

根据物种间同源基因的核酸序列相对保守并有一定同源性的特点, 以人 *Homo sapiens* 的 *cyclin L1* cDNA 序列为模板, 在 NCBI 的家蚕表达序列标签(expressed sequence tag, EST)数据库中筛选与之同源的 EST 序列, 选取 200 bp 以上, 同源性大于 60% 的家蚕 EST 序列, 利用 DNAStar 的 SeqMan 将检出序列拼接成 contig 后, 以此 contig 为被检序列再次进行检索, 重复上述操作, 直至所有检出的重叠 EST 序列不能继续延伸。最终校对的序列通过了家蚕基因组数据库的验证, 获得 1 条全长 1 885 bp 的序列。

对获得的电子克隆基因利用 NCBI 的完整开放阅读框(ORF)分析, 确定最大的 ORF 后, 用 Primer 5.0 软件跨 ORF 设计引物, 上游引物为 5′-TATTACAAAGACTAGTTTAAAG-3′; 下游引物为 5′-GTGTTTTATCATCTGTGTAG-3′, 由 Invitrogen 公司合成。以产后 1 - 7 d 的滞育与非滞育性蚕卵总 RNA 样品为模板, 以天根公司 TIANScript cDNA 第一链合成试剂盒反转录合成 cDNA 第一链。以合成的 cDNA 为模板进行 PCR 扩增。反应体系: 25 μL PCR 体系中含 10 × Buffer 2.5 μL, 25 mmol/L $MgCl_2$ 2 μL, 10 mmol/L dNTPmix 1 μL, cDNA 模板为 5 μg, 5 U/μL Taq 酶 0.25 μL, 10 μmol/L 正义引物和反义引物各 1 μL。反应条件: 94℃预变性 5 min, 然后 94℃ 45 s, 60℃ 45 s, 72℃ 1 min, 30 个循环, 最后 72℃延伸 10 min。取 40 μL PCR 扩增产物进行琼脂糖凝胶电泳回收特异性扩增片段, 与 pCR® 2.1 载体于 16℃过夜连接, $CaCl_2$ 法转化至 *E. coli* DH5α 中, 挑取阳性克隆并进行序列分析(赵晓瑜和李继刚, 2006)。

1.4 家蚕细胞周期蛋白基因的生物信息学分析

将 *BmCcnl1* 的 cDNA 序列提交 NCBI 数据库。通过在线软件(http://www.ebi.ac.uk/Tools/emboss/transeq/index.html)及 DNAMan 软件推导出 *BmCcnl1* cDNA 编码产生的氨基酸序列, 结构域预测通过 NCBI(http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi)在线分析。

1.5　阳性重组质粒的单酶切鉴定

根据 pCR® 2.1 载体在插入片段两侧各有一个 *Eco*R Ⅰ 的酶切位点，对 PCR 鉴定为阳性的重组质粒进行单酶切，对重组质粒进行酶切鉴定。

1.6　*BmCcnl1* 基因原核表达载体的构建

以经 PCR 鉴定和测序正确的 pCR® 2.1-*BmCcnl1* 质粒为模板，用带有限制性酶切位点的原核表达引物(上游引物：5′-CTA GCTAGC ACCACGAC GACCGTACAA-3′；下游引物：5′-CCG CTCGAG AT GTTTCCTTTTGTCATC-3′)进行 PCR 扩增，得到含有限制性酶切位点的目的基因片段。将目的基因与载体 pET-21d 经 *Nhe* Ⅰ 和 *Xho* Ⅰ 双酶切后 16℃ 过夜连接，$CaCl_2$ 法转化至 DH5α 中，以载体通用引物及基因特异引物进行 PCR 鉴定及双酶切法进行阳性克隆的筛选与鉴定。将经鉴定确认的阳性转化子提取重组质粒，转化至表达菌株 *E. coli* Rosetta 中。

1.7　BmCcnl1 蛋白的诱导表达及分析鉴定

将 PCR 鉴定后的含有 pET-21d-*BmCcnl1* 及含有空载体 pET-21d 的 *E. coli* Rosetta 菌液培养于含 Amp^+ 的 LB 液体培养基中 37℃，200 r/min 振荡培养 3 h 左右，使其 OD_{600} = 0.6 ~ 0.8 时，加入 IPTG (终浓度为 1 mmol/L) 诱导 4 h 取样，12% SDS-PAGE 电泳检测表达产物。

另取诱导 4 h 后的菌液，4℃ 8 000 r/min 离心 10 min 收集菌体，按 25∶1 的比例(菌液∶细菌裂解液)加入细菌裂解液及溶菌酶(至终浓度 1 mg/mL)，冰上孵育 30 min，轻柔涡旋裂解细胞后，用超声波使菌体完全破碎，离心分别收集上清和沉淀，然后进行 12% SDS-PAGE 电泳检测目的蛋白在上清和沉淀中的分布情况，确认重组蛋白的表达形式。

将 SDS-PAGE 电泳的目的蛋白条带转移到硝酸纤维素膜上，封闭液封闭后，以 Anti-His Antibody 为一抗，羊抗鼠 IgG-HRP 为二抗与之反应，最后用 HRP-DAB 底物显色试剂盒显色。

1.8　*BmCcnl1* 基因在家蚕胚胎期的表达检测

选择家蚕 *BmactinA3* 基因(GenBank 登录号：X04507)为内标基因。根据克隆得到的家蚕 *BmCcnl1* 基因全长序列设计用于 RT-PCR 分析的引物(表 1)。

分别取家蚕 932 品种产后 1 - 7 d 的非滞育与滞育性卵的总 RNA，调整 RNA 浓度后反转录成 cDNA，

表 1　本研究中所用引物

Table 1　Primers used in this study

基因 Gene	引物序列(5′-3′) Primer sequences	产物长度(bp) Product length
BmactinA3	F：TGGTAGTAGACAATGGCTCCG	158
	R：GCTCTGTGCCTCGTCTCCTA	
BmCcnl1	F：GCTGATAGCCTTGACATCG	182
	R：CCCATTGCCATAGTTTCC	

根据摸索的最适反应条件，用于 RT-PCR 分析的 PCR 反应条件设定为：94℃ 5 min→(94℃ 30 s→60℃ 45 s→72℃ 30 s) × 30 cycles→72℃ 10 min→4℃，2.5% 琼脂糖凝胶电泳并拍照记录结果。电泳条带用 Quantity one 凝胶图像分析系统进行灰度扫描，得到 *BmCcnl1* cDNA 扩增电泳条带的综合光密度值 M1 及 *BmactinA3* cDNA 扩增电泳条带的综合光密度值 M2。*BmCcnl1* mRNA 转录水平用相对光密度值(M1/M2 × 100%)来表示。根据得到的数据绘制 *BmCcnl1* mRNA 转录表达曲线。

2　结果与分析

2.1　家蚕 *Ccnl1* 基因的电子克隆

以人的 *cyclin L1* cDNA 序列为模板，经电子克隆，拼接到一条长 1 885bp 的序列(图 1)。该序列有完整开放阅读框(ORF)大小为 1 254 bp，编码产生 417 个氨基酸。在 NCBI 网站上利用 Protein blast 进行同源搜索，发现该蛋白序列与人 *Homo sapiens* 和斑马鱼 *Danio rerio* 等物种的 *cyclin L1* 的氨基酸序列相似性在 60% 以上，于是将此基因命名为 *Bmcyclin L1* (*BmCcnl1*)。

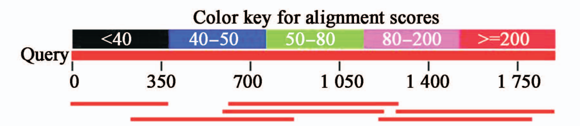


图 1　组成家蚕 *BmCcnl1* 的 EST 序列

Fig. 1　The EST sequences of *BmCcnl1* gene from *Bombyx mori*

2.2　*BmCcnl1* 基因的 RT-PCR 扩增和重组质粒的单酶切鉴定

以产后 1 d 的非滞育性卵的总 RNA 为模板，经反转录后用所设计基因的克隆引物进行扩增，产物经 1% 的琼脂糖凝胶电泳分析，出现与预期大小 1 329 bp相符的 DNA 泳带(图 2)。回收目的条带，

与 pCR® 2.1-T 载体连接构建 pCR® 2.1-*BmCcnl1* 重组质粒，蓝白斑筛选阳性克隆 PCR 鉴定，结果如图3。将初步鉴定为阳性克隆的重组质粒的菌液送上海英骏生物技术有限公司进行测序。测序结果显示(图5)家蚕 *BmCcnl1* 扩增区间内的核苷酸与预计的 *BmCcnl1* 电子克隆序列相符。将 *BmCcnl1* 基因的完整开放阅读框(ORF)提交到 NCBI，GenBank 登录号为 FJ889988。

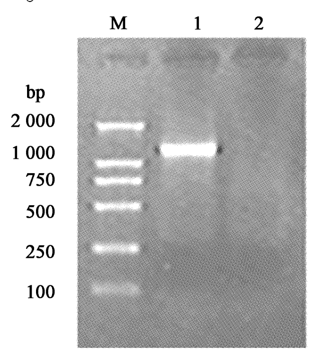


图2 *BmCcnl1* 的 PCR 扩增

Fig. 2 PCR amplification of *BmCcnl1*

M：DNA 分子量标准 DL2000 marker；1：PCR 扩增结果 The amplified *BmCcnl1*；2：引物的阴性对照 Negative control for primers.

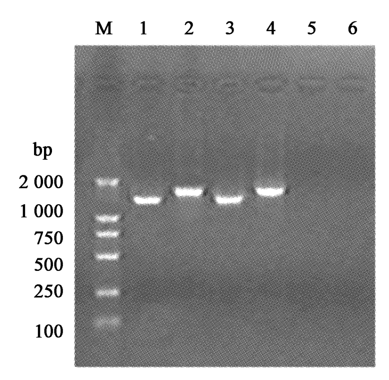


图3 Double PCR 检测重组阳性克隆

Fig. 3 Identification of the recombinant plasmid of *BmCcnl1* by double PCR

M：DNA 分子量标准 DL2000 marker；1，3：特异引物的扩增产物 The amplification products with the specific primers of *BmCcnl1*；2，4：载体通用引物的扩增产物 The amplification products with the universal primers M13/M13T of the cloning plasmid pCR® 2.1；5，6：用特异引物和通用引物扩增的阴性对照 The negative control amplified with the specific and universal primers.

2.3 重组质粒的单酶切鉴定

用 *Eco*RⅠ对重组质粒进行单酶切鉴定，结果如图4。由图4可知，单酶切后的重组质粒可以产生两条电泳泳带，一条为线性化的载体质粒(约3.9 kb)，另一条为插入的目的基因的片段(约1.35 kb)，对照 PCR 扩增的目的基因片段为 1 329 bp。酶切结果证实已得到带有目的基因片段的阳性重组质粒，命名为 pCR® 2.1-*BmCcnl1*。

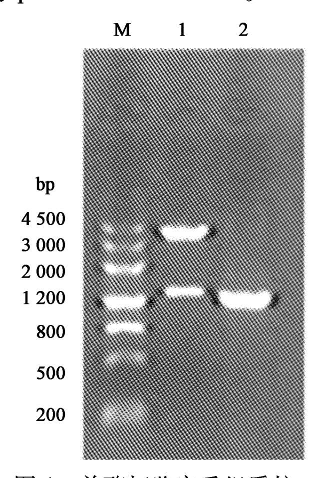


图4 单酶切鉴定重组质粒

Fig. 4 The single digest identification of the recombinant plasmid

M：DNA 分子量标准 DNA molecular weight marker Ⅲ；1：重组阳性质粒单酶切 The single digest of the recombinant plasmid；2：PCR 扩增产物阳性对照 The amplification product of *BmCcnl1*.

2.4 *BmCcnl1* 编码蛋白的功能分析

通过在线软件及 DNAMan 软件推导出 *BmCcnl1* cDNA 编码产生的氨基酸序列(图5)，并利用 Expasy 网站在线分析得出 BmCcnl1 蛋白预测分子量为49 kDa，等电点为9.84。利用 NCBI 在线预测蛋白序列的功能结构域，如图6所示，BmCcnl1 属于细胞周期蛋白超家族，且具有 Cyclin 的保守结构域。

2.5 BmCcnl1 的诱导表达和表达条件优化

将重组表达质粒 pET-21d-*BmCcnl1* 转入 *E. coli* Rosetta 中，经 IPTG 诱导后，SDS-PAGE 电泳检测，在50 kDa 左右出现一条蛋白带（图7），由于 BmCcnl1 的预测分子量为49 kDa，证明 BmCcnl1 蛋白在 Rosetta 中得到表达。

对 BmCcnl1 蛋白的表达条件进行优化，结果表明菌液起始浓度是影响 BmCcnl1 蛋白表达量的关键因素。一般蛋白在菌液处于对数生长期时加入诱导剂 IPTG 诱导表达能够获得较高的表达量，而 BmCcnl1 蛋白的表达需要菌液进入稳定期后才能获得较高的表达量，结果见图8；BmCcnl1 蛋白在不同的诱导温度均能表达，但表达量有所不同，30℃诱导表达的蛋白量略高，结果见图9。

```
1     ATGACCACGACGACCGTACAAAACCAACCGAAGTCTAACAATTCACAGCACAATACACCACCTGCAAAGCTTCAG
1      M  T  T  T  T  V  Q  N  Q  P  K  S  N  N  S  Q  H  N  T  P  P  A  K  L  Q
76    AAGACGTATGGGAAGATAGTTTTGACGCTCTACAATTGTCTTCTACCGGAATCAGTATTCAAGGAGACACCTTCA
26     K  T  Y  G  K  I  V  L  T  L  Y  N  C  L  L  P  E  S  V  F  K  E  T  P  S
151   CAAGCTGATAGCCTTGACATCGAAACTGAGACGGATCTTAGGATCCTGGGTTGCGAAATGATACAAACAGCTGGC
51     Q  A  D  S  L  D  I  E  T  E  T  D  L  R  I  L  G  C  E  M  I  Q  T  A  G
226   ATCCTGCTCCGGCTACCCCAAGTAGCTATGGCGACTGGTCAGATTTATCTACAAAGGTTTTACTACTCGAAATCA
76     I  L  L  R  L  P  Q  V  A  M  A  T  G  Q  I  Y  L  Q  R  F  Y  Y  S  K  S
301   TTTGTACGATATCCCATGGAAACTATGGCAATGGGTAGCATATACTTAGCGTCCAAAGTCGAAGAGAAACCATGC
101    F  V  R  Y  P  M  E  T  M  A  M  G  S  I  Y  L  A  S  K  V  E  E  K  P  C
376   AGAATAAGAGATGTAATCAACGTGTTTCACCACATCAAACAGGTCAGAGCACAGAAAACAATAAGTCCAATGTTA
126    R  I  R  D  V  I  N  V  F  H  H  I  K  Q  V  R  A  Q  K  T  I  S  P  M  L
451   GTTGACCAAAATTACATAGAATTGAAAAATCAGGTCATCAAAGCTGAAAGACGTATCTTAAAAGAGCTCGGATTC
151    V  D  Q  N  Y  I  E  L  K  N  Q  V  I  K  A  E  R  R  I  L  K  E  L  G  F
526   TGTGTACATGTTAAACATCCACACAAACTTATTGTGGTTTACTTACAATTACTGCAATATGAAAAAAACCGCCAA
176    C  V  H  V  K  H  P  H  K  L  I  V  V  Y  L  Q  L  L  Q  Y  E  K  N  R  Q
601   CTAATGCAAATGGCTTGGAACTACATGAATGATGCTCTAAGGACAGATGTCTTTATGAGATTTCCTCCTGAAACC
201    L  M  Q  M  A  W  N  Y  M  N  D  A  L  R  T  D  V  F  M  R  F  P  P  E  T
676   ATTGCATGTGCTTGCATTTACTTGACGGCCAGAAAAATAGGTTTGCCGCTGCCCAATAACCCACACTGGTTCCTT
226    I  A  C  A  C  I  Y  L  T  A  R  K  I  G  L  P  L  P  N  N  P  H  W  F  L
751   CTATTCAAAGTTACAGAAGATGATATCAGGGAAGTCTCAATGAGGATACTACAATTATATAAACGTGCTAAAGTC
251    L  F  K  V  T  E  D  D  I  R  E  V  S  M  R  I  L  Q  L  Y  K  R  A  K  V
826   AACCCTGAAGAATTGGAGACTAAAGTTGAAAACCTCCGCAAAATATACATAGCTAATAAACATTCACAGGCAATA
276    N  P  E  E  L  E  T  K  V  E  N  L  R  K  I  Y  I  A  N  K  H  S  Q  A  I
901   AAAGATAAAGAAGCTAAGAACGAAGAAAAGAAACCCGAATCACCCACTGCATCAACTTCTAAAGACACCAGACGG
301    K  D  K  E  A  K  N  E  E  K  K  P  E  S  P  T  A  S  T  S  K  D  T  R  R
976   GATACTAAGAAAGAAAAATCTCCTAAAACTCCACCTTTATCCTCAAAGTATCACAGTAGTCATAAATCAAAGAAG
326    D  T  K  K  E  K  S  P  K  T  P  P  L  S  S  K  Y  H  S  S  H  K  S  K  K
1051  GAGCGGAGGTCAAGATCTCCTTATGATAAGAAGAGGGATTATTCAAGTAAGAGGCATCGTTCAAGGTCTCGTGAT
351    E  R  R  S  R  S  P  Y  D  K  K  R  D  Y  S  S  K  R  H  R  S  R  S  R  D
1126  CGTGATGCAGATCGTTCTAAGGATCGGAGATCTGATGACAAGCGTAGTAGGATGTCTTCGAGGAAATATGATGAT
376    R  D  A  D  R  S  K  D  R  R  S  D  D  K  R  S  R  M  S  S  R  K  Y  D  D
1201  TATGACAGGTCAAAGTCAAGTCGTGATGGACGGGATGACAAAAGGAAACATTAG
401    Y  D  R  S  K  S  S  R  D  G  R  D  D  K  R  K  H  *
```

图 5　*BmCcnl1* 的核苷酸序列及推导的氨基酸序列

Fig. 5　Nucleotide and the deduced amino acid sequences of *BmCcnl1*

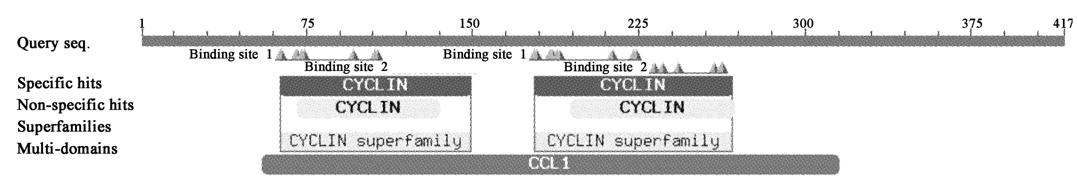


图 6　*BmCcnl1* 蛋白序列保守结构域预测

Fig. 6　Prediction of the conserved domain of *BmCcnl1*

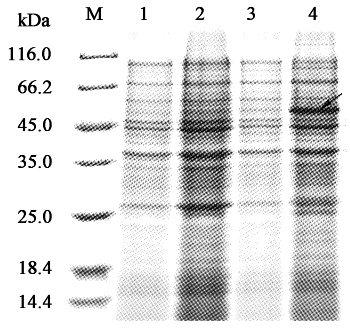


图 7　BmCcnl1 诱导表达产物的 SDS-PAGE 电泳

Fig. 7　SDS-PAGE of induced-expression product of BmCcnl1

M：蛋白质分子量标准 Protein molecular weight marker；1，2：空质粒诱导前后 Rosetta with pET-21d before and after induction with IPTG；3，4：重组质粒诱导前后 Rosetta with pET-21d-*BmCcnl1* before and after induction with IPTG；箭头所指为目的蛋白条带 The arrow indicated the target protein band. 下图同 The same for the following figures.

2.6　表达产物的可溶性分析及 Western blotting 鉴定

重组菌经 IPTG 诱导后将诱导产物处理，分别对沉淀和上清液进行 SDS-PAGE 分析，发现重组蛋白基本以包涵体形式存在于沉淀中(图 10)。对诱导表达的重组菌及其可溶性分析的上清和沉淀作 Western blotting 分析，表明诱导后细菌裂解物及沉淀中有一条大小为 50 kDa 左右的条带出现(图 11)。

2.7　*BmCcnl1* 基因在家蚕胚胎期的表达水平

采用 RT-PCR 的方法对 *BmCcnl1* 基因在产后 1–7 d 的非滞育和滞育性卵中的转录表达进行了分析，结果如图 12 和 13 所示，由图 12 和 13 可以看出，*BmCcnl1* 基因的 mRNA 在非滞育性卵胚胎发育

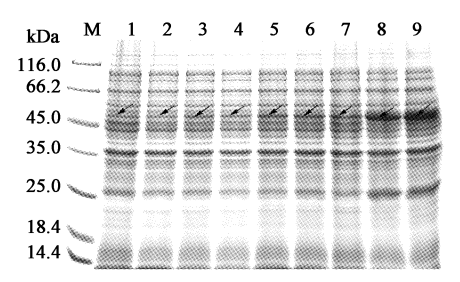


图 8 菌液起始浓度对 BmCcnl1 蛋白表达的影响

Fig. 8 Influence of bacteria concentration on the induced-expression of BmCcnl1

M：蛋白质分子量标准 Protein molecular weight marker；1－9：重组菌在菌液浓度（OD_{600}）分别为 0.2，0.3，0.4，0.5，0.6，0.8，1.0，1.2，1.4 时加入 IPTG 诱导 4 h 的细菌裂解物 The bacteria lysate with the recombinant expression plasmid at 4 h after induction with IPTG when the bacteria concentration（OD_{600}）is 0.2，0.3，0.4，0.5，0.6，0.8，1.0，1.2 and 1.4，respectively.

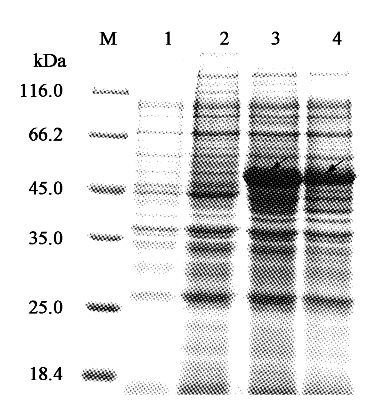


图 9 诱导温度对 BmCcnl1 蛋白表达的影响

Fig. 9 Influence of induction temperature on the expression of BmCcnl1

M：蛋白质分子量标准 Protein molecular weight marker；1，2：含空载体质粒的 Rosetta 诱导前后 Rosetta with pET-21d before and after induction with IPTG；3，4：分别为 30℃、37℃诱导表达 4 h 的细菌裂解物 The bacterial lysate of induced expression at 30℃ and 37℃ for 4 h，respectively.

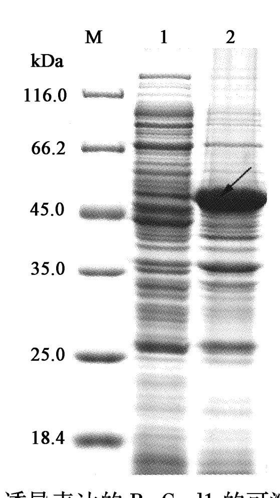
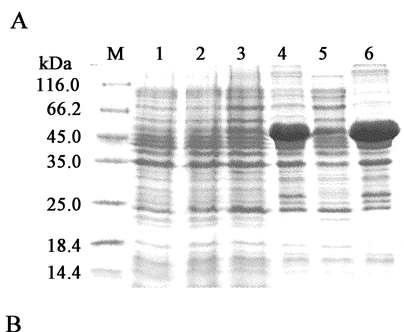


图 10 诱导表达的 BmCcnl1 的可溶性分析

Fig. 10 The solubility analysis of the recombinant expressed BmCcnl1

M：蛋白质分子量标准 Protein molecular weight marker；1：菌体裂解液的上清 The supernate of the bacterial lysate；2：菌体裂解液的沉淀 The deposition of the bacterial lysate.



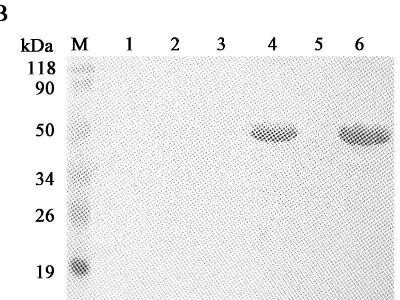


图 11 SDS-PAGE（A）和 Western blotting（B）检测 *BmCcnl1* 的表达

Fig. 11 Identification of the recombinant expression of BmCcnl1 by SDS-PAGE（A）and Western blotting（B）

M：蛋白质分子量标准 Protein molecular weight marker；1，2：含空质粒菌诱导前后 Rosetta with pET-21d before and after induction；3，4：重组菌经 IPTG 诱导前后 Rosetta with the recombinant expression plasmid before and after induction；5，6：细菌裂解液上清和沉淀 The supernate and the deposition of the bacterial lysate.

阶段基本保持相对稳定的转录表达，而在滞育性卵中，当其从蛾体产下经过 72 h 后已经检测不到 *BmCcnl1* 基因的转录，同时内参基因 *BmactinA3* 在 72 h 后也检测不到转录表达。

3 讨论

随着人类和多种模式生物基因组计划的实施，表达序列标签（expressed sequence tag，EST）在基因结构与功能研究中的应用日益广泛（Adams *et al.*，1991；张迪等，2010）。利用生物信息学资源和技术研究基因组结构与功能、发现新的功能基因、揭示基因起源与分子进化规律等已成为后基因时代的热点研究（金红建等，2005）。利用生物信息学方法开展基因挖掘及表达分析是一种行之有效的技术手段

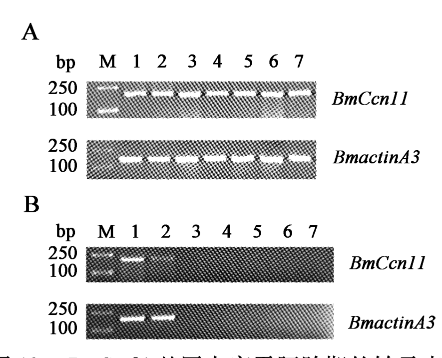


图 12　*BmCcnl1* 基因在家蚕胚胎期的转录表达

Fig. 12　The transcript expression of *BmCcnl1* at the embryonic stage

A：基因在非滞育性卵中的转录检测 The transcript expression of genes in the non-diapause eggs；B：基因在滞育性卵中的转录检测 The transcript expression of genes in the diapause eggs；M：DL2000 marker；1 –7：分别为卵龄 1 –7 d 的蚕卵 1 –7 d-old eggs，respectively.

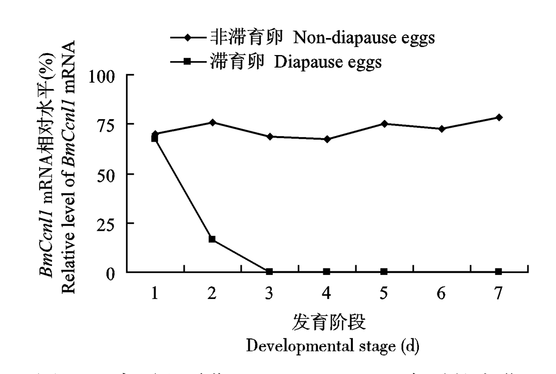


图 13　家蚕胚胎期 *BmCcnl1* mRNA 水平的变化

Fig. 13　The transcript expression of *BmCcnl1* mRNA at the embryonic phase

（Gill and Sanseau，2000；Muhle *et al*.，2001）。在本研究中，我们利用人的 *cyclin L1* 同源基因为信息模板，对家蚕 EST 库进行同源比对，经过反复的延伸和比对，快速获得家蚕 *BmCcnl1* 基因的全长 cDNA 序列，并经过生物学验证了电子拼接的正确性。

胚胎发育一直是生命科学研究中的主题之一。哺乳动物的胚胎发育一直是研究的热点，相比较而言，家蚕胚胎发育的分子生物学研究较为滞后。由受精卵到 1 龄幼虫的发育过程中，正是细胞进行大量分裂和分化的时期，这一个时期的胚胎，是探索细胞分裂的分子调控机制的理想期，我们利用生物信息学的技术和基因工程的技术方法，成功克隆了家蚕细胞周期蛋白基因 *BmCcnl1*，cDNA 序列已登录到 GenBank，登录号为 FJ889988。利用 Protean 软件分析得出 BmCcnl1 蛋白预测分子量为 49 kDa，等电点为 9.84。根据 NCBI 的结构域预测蛋白序列的功能结构域，BmCcnl1 属于细胞周期蛋白超家族，且具有 Cyclin 的保守结构域，表明该基因在进化上比较保守。

BmCcnl1 基因在家蚕胚胎期的进程中，通过对其 mRNA 表达水平的跟踪分析，发现胚胎发育到 72 h 时，已经检测不到 *BmCcnl1* 基因的表达，这种现象表明，滞育性卵的细胞分化停滞于 G2 期后，该基因也进入沉默状态。但从以往学者的研究报道中，蚕卵从蛾体产下后经过 72 h 的发育，其卵内的糖原等物质还是有较大的变化的（吴大洋，1996），这就告诉我们，调控蚕卵进入滞育的基因当进入沉默状态或表达很弱时，蚕卵为了完成其滞育过程，体内生理生化的代谢仍在继续，基因进入沉默过程与体内生理生化的代谢过程存在一定时序的距离，其跨度时间是多少，是值得我们今后探索的。通常，有滞育性的家蚕卵产后经过 7 d 便完全进入滞育状态，胚胎的发育停留在一个相对不变的发育阶段，细胞停止分裂，一直以临界期胚子状态维持，基于此推测家蚕胚胎进入滞育后，为了节省生命体的能量物质消耗，关闭了某些基因，可能只保留供生命体基本代谢所需的基因，至于保留了哪些基因的活性还需进一步的实验证实。

Chen 等（2006）研究证实，在大鼠中 Cyclin L1 能够与 CDK12 形成复合体调控 RNA 的可变剪切，Herrmann 等（2007）的研究结果也表明 Cyclin L1 构成剪切因子的固定组成部分。由于 *BmCcnl1* 基因具有较强的保守性，并且 BmCcnl1 的氨基酸序列的羧基端具有 SR（富含精氨酸和丝氨酸）结构域，而具有该结构域的 SR 家族蛋白是重要的剪切因子（Graveley，2000），推测在家蚕中该基因具有类似的功能，调控 RNA 的可变剪切。但还需进一步的实验验证，下一步可采用 Northern blotting、抗体实验、荧光免疫电镜等对其在家蚕内是否参与可变剪切进行研究。

参 考 文 献（References）

Adams MD，Kelley JM，Gocayne JD，Dubnick M，Polymeropoulos MH，Xiao H，Merril CR，Wu A，Olde B，Moreno RF，Kerlavage AR，McCombie WR，Venter JC，1991. Complementary DNA sequencing：expressed sequence tags and human genome project. *Science*，252：1651 –1656.

Chen HH，Wang YC，Fann MJ，2006. Identification and characterization of the CDK12/cyclin L1 complex involved in alternative splicing regulation. *Mol. Cell Biol*.，26（7）：2736 –2745.

Duronio RJ，O'Farrell PH，Xie JE，Brook A，Dyson N，1995. The transcription factor E2F is required for S phase during *Drosophila* embryogenesis. *Genes Dev*.，9：1445 –1455.

Fang F, Newport JW, 1993. Distinct roles of cdk2 and cdc2 in RP-A phosphorylation during the cell cycle. *J. Cell Sci.*, 106(3): 983 – 994.

Gao Y, Lin LP, Ding J, 2005. A review: cell cycle regulation. *Chinese Bulletin of Life Sciences*, 17(4): 318 – 322. [高燕, 林莉萍, 丁健, 2005. 细胞周期调控的研究进展. 生命科学, 17(4): 318 – 322]

Gill RW, Sanseau P, 2000. Rapid in silico cloning of genes using expressed sequence tags (ESTs). *Biotechnol. Annu. Rev.*, 5: 25 – 44.

Graveley BR, 2000. Sorting out the complexity of SR protein functions. *RNA*, 6: 1197 – 1211.

Herrmann A, Fleischer K, Czajkowska H, Müller-Newen G, Becker W, 2007. Characterization of *cyclin L1* as an immobile component of the splicing factor compartment. *FASEB J.*, 21 (12): 3142 – 3152.

Hunter T, Pines J, 1994. Cyclins and cancer Ⅱ: cyclin D and CDK inhibitors come of age. *Cell*, 79(4): 573 – 582.

Jin HJ, Shao JZ, Xiang LX, 2005. In silico cloning and digital differential display analysis of *Danio rerio* QM gene by EST database searching. *Journal of Fisheries of China*, 29(5): 599 – 605. [金红建, 邵健忠, 项黎新, 2005. 表达序列标签数据库搜索克隆斑马鱼 QM 基因及其数字化差异显示分析. 水产学报, 29(5): 599 – 605]

Knoblich JA, Lehner CF, 1993. Synergistic action of *Drosophila* cyclins A and B during the G_2-M transition. *EMBO J.*, 12(1): 65 – 74.

Muhle RA, Pavlidis P, Grundy WN, Hirsch E, 2001. A high-throughput study of gene expression in preterm labor with a subtractive microarray approach. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 185(3): 716 – 724.

Nakagaki M, Takei R, Nagashima E, Yaginuma T, 1991. Cell cycles in embryos of the silkworm, *Bombyx mori*: G_2-arrest at diapause stage. *Roux's Archives of Developmental Biology*, 200(4): 223 – 229.

Pines J, Hunter T, 1991. Cyclin-dependent kinases: a new cell cycle motif? *Trends Cell Biol.*, 1(5): 117 – 121.

Reed SI, 1992. The role of p34 kinases in the G1 to S-phase transition. *Annu. Rev. Cell Biol.*, 8: 529 – 561.

Sherr CJ, 1994. G1 phase progression: cycling on cue. *Cell*, 79(4): 551 – 555.

Sherr CJ, Roberts JM, 1999. CDK inhibitors: positive and negative regulators of G_1-phase progression. *Genes Dev.*, 13: 1501 – 1512.

Sudhakar B, Gopinathan KP, 2000. Expression of cyclin E in endomitotic silk-gland cells from mulberry silkworm. *Gene*, 257 (1): 77 – 85.

Takahashi M, Niimi T, Ichimura H, Sasaki T, Yamashita O, Yaginuma T, 1996. Cloning of a B-type cyclin homolog from *Bombyx mori* and the profiles of its mRNA level in non-diapause and diapause eggs. *Dev. Genes Evol.*, 206(4): 288 – 291.

Wu DY, 1996. The physiological metabolism during the diapause of the silkworm eggs. *Newsletter of Sericultural Science*, 1: 19 – 22. [吴大洋, 1996. 家蚕卵滞育过程中的生理代谢. 蚕学通讯, 1: 19 – 22]

Xu WH, 1999. Advances in insect diapause studies. *Acta Entomologica Sinica*, 42(1): 100 – 107. [徐卫华, 1999. 昆虫滞育的研究进展. 昆虫学报, 42(1): 100 – 107]

Yang ZY, Li JL, 2004. A brief developmental history of studies on cell cycle and cell cycle control. *Chin. J. Med. Hist.*, 34(3): 176 – 179. [杨兆颖, 李金梁, 2004. 细胞周期及其周期调控研究的发展简史. 中华医史杂志, 34(3): 176 – 179]

Zhang CD, Tan J, Zhao DH, Liu D, Feng YX, Pan MH, Lu C, 2009. Molecular cloning and expression pattern analysis of cyclinA gene in the silkworm, *Bombyx mori*. *Acta Sericologica Sinica*, 35(4): 761 – 767. [张春冬, 谈娟, 赵丹红, 刘迪, 冯业勋, 潘敏慧, 鲁成, 2009. 家蚕周期蛋白 A 基因(*BmcyclinA*)的克隆和表达谱分析. 蚕业科学, 35(4): 761 – 767]

Zhang D, Ren GD, Tang T, Dong XY, Liu FS, 2010. Cloning, prokaryotic expression and activity detection of the metallothionein gene in *Musca domestica* (Diptera: Muscidae). *Acta Entomologica Sinica*, 53(4): 379 – 384. [张迪, 任国栋, 唐婷, 董晓寅, 柳峰松, 2010. 家蝇金属硫蛋白基因的克隆、原核表达及活性检测. 昆虫学报, 53(4): 379 – 384]

Zhao XY, Li JG, 2006. Practical Technology of Molecular Biology. Chemical Industry Press, Beijing. 52 – 64. [赵晓瑜, 李继刚, 2006. 实用分子生物学技术. 北京: 化学工业出版社. 52 – 64]

Zou XY, Li LH, 2006. Cell cycle control and tumor. *Int. J. Genet.*, 29 (1): 70 – 73. [邹向阳, 李连宏, 2006. 细胞周期调控与肿瘤. 国际遗传学杂志, 29(1): 70 – 73]

(责任编辑: 赵利辉)